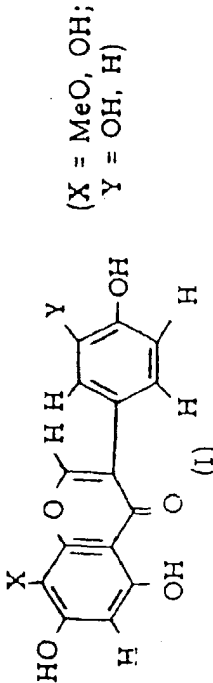


DERWENT PUBLICATIONS LTD.

27437

| | | | |
|---|---|-------------------|-----------|
| 27437A/15 MICROBIOCHEMICAL RE 19.06.74 JA-069119 (25.12.75) A23k A61k C12d Physiologically active iso-flavone prodn. - by aerobically culturing Aspergillus on potato starch, glucose, soybean medium | R02 D16 MICR-19.06.74 *J5 0160-483 | R(6-A1) D(5-C), I | 77 |
| <p>Isoflavones (I)</p>  <p>(X = MeO, OH; Y = OH, H)</p> <p>are produced by an aerobic culture of fungi; 3',4',5,7-tetrahydroxy-8-methoxyisoflavone (II), psi-tectorigenin (III, X = OMe, Y = H), and 8-hydroxygenistein (IV, X = OH, Y = H) are produced by Aspergillus.</p> <p>USE L-Dopa decarboxylase inhibitor.</p> <p>EXAMPLE A. niger NRRL 3122 was cultured with shaking at 27°C for 5 days on a medium (pH 6.0) contg. potato starch 2 glucose</p> | <p>1, soybean meal, 2, KH_2PO_4 0.1, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; the pH changed to 5.6, 3.6, 3.2, 5.0 and 6.2 after 1, 2, 3, 4, and 5 days of the cultivation. The culture filtrate (9 l.) was extd 3 times with 4.5 l. BuOAc at pH 2.0. The cells (1.2 kg) are also extd. with 5 l. MeOH and concd. to dryness. The active substances were extd. with 1 l. water (pH 8.0) and then with 0.5 l. BuOAc 3 times at pH 2.0 and combined with the above extract of the culture filtrate. The combined extract was concd. to dryness yielding 12.3 g tar substance. It was subjected to silica gel chromatography eluting with CHCl_3-Me MeOH (50:1) to separate (III), genistein (V), (II), orobole (VI) and (IV). Each fraction was dried, subjected to "Sephadex LH-20" (RTM) silica gel chromatography and crystd. from MeOH-C_6H_6. Yields were 15.8, 4.8, 80.3, 0.1, and 4 mg for (II), (III), (V), (VI) and (IV). They were sol. in alkaline water, MeOH, EtOH, BuOH, Me_2CO, DMSO and hardly sol. in C_6H_6, CHCl_3 and toluene. ID_{50} against β-3,4-dihydroxy-phenyl-L-alanine decarboxylase were 0.2, 51.0, and 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for (II), (III) and (IV). (14pp-).</p> | 27437A | J50160483 |



第 2 号 後記なし

特 許 願 (特許法第 2 条第 1 項第 1 号)
昭和 49 年 6 月 19 日

特許庁長官 御座
1. 発明の名称 生理活性を有するイソフラボン
ン化合物の微生物による製造法
2. 特許請求の範囲に記載された発明の数・・・

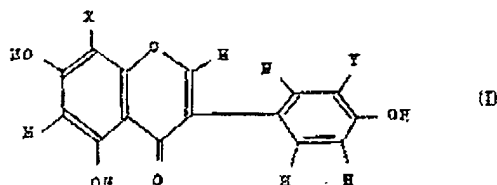
3. 発明者
注 明 東京都港区麻生北 4 丁目 2 番地
氏 名 海 峯 英 夫 外 2 名
4. 特許出願人
住 所 東京都品川区上大崎 3 丁目 1 番 2 3 号
名 称 財団法人 微生物化学研究会

代表者 市 川 繁 二
一 係 一
5. 代理人
住 所 〒105 東京都港区西新橋 1 丁目 2 番 9 号
三井物産館内 電話 (591) 0261 番
(2400) 氏 名 金 丸 義 男
19 969119

明 細 書

1. 発明の名称
生理活性を有するイソフラボン化合物の
微生物による製造法

2. 特許請求の範囲
(1) 系状通に属する次の一般式



(式中、X はメトキシ基で Y はヒドロキシ基であるか又は X はメトキシ基で Y は水素原子であるか又は X はヒドロキシ基で Y は水素原子である) のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式 (I) のイソフラボン化合物の製造法。

1

⑬ 日本国特許庁

公開特許公報

⑪ 特開昭 50-160483
⑫ 公開日 昭 50. (1975) 12. 25
⑬ 特願昭 49-69119
⑭ 出願日 昭 49. (1974) 6. 19
審査請求 未請求 (全 14 頁)

庁内整理番号

7110 49
6617 44
7169 44

⑮ 日本分類

36(2)D521
30 A32
16 E41

⑯ Int. Cl²

C12D 13/00
A61K 37/64
A61K 31/35
A23K 1/16

(2) アスベルギルス菌に属する 3', 4', 5, 7-ケートラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3', 4', 5, 7-ケートラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボンの製造法。

(3) アスベルギルス菌に属する プサイ・ナクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、プサイ・ナクトリゲニンの製造法。

(4) アスベルギルス菌に属する 8-ハイドロキシゲニステイン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ハイドロキシゲニステインの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物を用いる醗酵法によりドーパ脱炭酸酵素系に対して阻害作用をもつ新規物質 3', 4', 5, 7-ケートラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボン、あるいは公知物質 4', 5, 7-ケートラハイドロキ

2

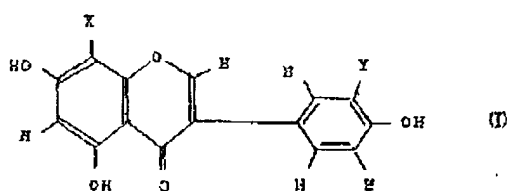
シ-8-メトキシイソフラボン(すなわちプサイ・テクトリゲニン(pai-tectorigenin))又は4,6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン(すなわち8-ヒドロキシゲニステイン(8-hydroxygenistein))を製造する方法に関する。

本発明者は人の高血圧症及びパー・キンソン氏病のドーパでの治療における医薬品の開発を目的として、微生物の培養液中にアロマトキシクアミノ酸類のカルボキシル基を脱炭酸するドーパ脱炭酸酵素(以下D.D.Oと略記する)の作用を阻害する物質を系統的に検索し、該状態の培養液及び菌体中にD.D.O阻害物質が各種存在することをみだし、これらを抽出単離し化合物を究めイソフラボン骨格を持つ3種の化合物である事を見出した。さらに化学的な詳細な研究から、これら化合物の一つは新規化合物である3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボンである事を明かにするとともに他の二つの化合物が4,6,7,8-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン及び4,6,7,8-テトラヒドロキシイソフラボン

3

ン基でY=水素原子である場合の化合物が8-ヒドロキシゲニステイン(以下では化合物(II)ともいう)である。

それ故、本発明の要旨とするところは、永状態に属する次の一般式、



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)のイソフラボン化合物の生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することを特徴とする、微生物による上記一般式(II)のイソフラボン化合物の製造法にある。

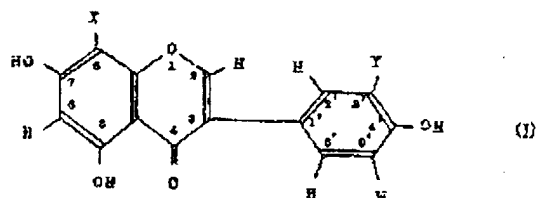
本発明以降においては、別記化合物(III)は天然物

4

特開 1350-160483(2)

ンであることを特定した。またこれら3種の化合物を微生物の培養物から採取する方法を説明した。

上記の3つのイソフラボン化合物は次の一般式



(式中、Xはメトキシ基でYはヒドロキシ基であるか又はXはメトキシ基でYは水素原子であるか又はXはヒドロキシ基でYは水素原子である)で表わされるが、一般式(I)においてX=メトキシ基及びY=ヒドロキシ基である場合の化合物が新規化合物3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシイソフラボン(以下では化合物(I)ともいう)であり、X=メトキシ基及びY=水素原子である場合の化合物がプサイ・テクトリゲニン(以下では化合物(III)ともいう)であり、さらにX=ヒドロキ

5

としても化学合成物としても報告されておらず本発明者が初めて発見した新規化合物である。また化合物(III)は、テクトリゲニンの構造異性体として、ウィルソン・ベイカー等(Wilson Baker et al)により1953年初めて合成されChemistry and Industry March 277, 1953, に報告されており、化合物(III)については1960年ブタペスト工科大学のエル・ファルカスとジュー・バラディ(L. Farkas and J. Várady)により合成されActa chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 24, 225-230, 1960に報告されているが、いずれの化合物も微生物の培養物より採取したのは本発明者が最初である。さらに本発明者はこれら化合物(I), (II), (III)の各種生物活性に対する阻害作用の研究から、D.D.O阻害活性を有することの他、これら化合物がヒスチジン脱炭酸酵素(以下H.D.Oと略記する)阻害活性、カチニールオーメタル転位酵素(以下COMTと略記する)阻害活性及びエストロゲン活性を有することを見出した。これら阻害阻害活性は本発明者により

されてある(昭和46年4月28日特許審判請求)。

微生物は人工的に、又自然界においても実験を施しやすいが本発明にいうアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 はその繁殖の余てを包括する。本発明に示う菌種はインフラザン化合物(I), (II), (III)を生産し、これらの菌及び菌種と明確に区別されないものはすべてこれを包括する。

それ故、本発明の第一の実施態様によれば、アスペルギルス菌に属する3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシインフラザン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、3,4,5,7-テトラヒドロキシ-8-メトキシインフラザンの製造法が提供される。

また、本発明の第二の実施態様によれば、アスペルギルス菌に属するブサイ・テクトリゲニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、ブサイ・テクトリゲニンの製造法が提供される。

さらに、本発明の第三の実施態様によれば、ア

8

初めて明らかにされ、これ以前には知られていなかった。以上の産業的有用性を有する化合物(I), (II), (III)は、D.D.C及びDDMT活性を阻害することから、パーキンソン氏病のドーパでの治療における賦活薬として、ノルアドレナリンの生合成を阻害することにより高血圧症の治療薬、H.D.C.阻害を阻害することから、抗アレルギー、抗炎症、の治療薬として、またエストロゲン活性を有する事から避妊及び動物での体質増加、生育促進剤としての用途が与えられる。

本発明の方法で用いる糸状菌に属する一般式(II)の化合物の生産菌の一例としてはアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 (*Aspergillus niger* NRRL 3122)があり、このアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 株は、米国農務省農薬研究局北部利用研究所発部(NRRL)に保存された公知の保存菌であつて本発明者らがNRRLより分譲を受けたものである。なお、このアスペルギルス・ニガー NRRL-3122 株は工務技術院微生物工務技術研究所に保工研発第2053号として登録

7

アスペルギルス菌に属する8-ヒドロキシグアニン生産菌を好氣的に培養して該化合物を生産せしめ、培養物から該化合物を採取することから成る、8-ヒドロキシグアニンの製造法が提供される。

本発明の方法を実施するに当つては、使用生産菌を微生物の通常公知の培養法で好氣的に培養して培養物中に目的化合物を生産せしめることができる。また本発明の目的化合物(I), (II), (III)を生産せしめるためにカビ、放線菌その他の微生物の培養に用いられる培養基はすべて利用できる。例えば炭源としてはグルコース、マルトース、デキストリン、澱粉、ラクトース、サツカロース、グリセリンなど、又窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母、酵母エキス、大豆粉、綿実粉、落花生粉、コーンスチープリカー、米ぬか、無機窒素化合物などを利用できるが、特に化合物(I), (II), (III)の生産のためには、グルコース、酵母を炭素源とし、大豆粉を窒素源とした培養基、これら化合物の生産のため好ましい培養基である。化合物(I),

(II), (III)を生産せしめるため必要とするならば、無機塩、金属塩、重金属塩の濃度を加えることもできる。なお培養液中に於けるいれ培養液中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(I), (II), (III)の生産のための培養温度は20~30℃が好ましく、化合物(I), (II), (III)は好氣的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる。而とう培養法、通気装置タンク培養法がそのまま本発明のために用いられる。

化合物(I), (II), (III)の生産菌の一例であるアスペルギルス・ニガー NRRL 3122を、グルコース1%, 硫酸鉄デンプン2%, ノイビーンミール2%, 3FePO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%を含む生産培養基に接種し37℃で6日間振とう培養した時培養液のpHは6.0程度になり、化合物(I), (II), (III)の生産は最高に達する。また化合物(I), (II), (III)の培養液中での生産濃度は、前述した、培養時の条件によつて異なる事は専門家に於て公知

の事実である。したがって菌株の改良、培養条件の選定によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。さらにアスペルギルス・ニガー NRRL 3122 を上述の如く培養したとき、培養物中に金剛化合物オロボル並びにゲネステイン（何れもインフラボンの一様）を生成していることが認められた！本出願人の同日出願に係る特願第49-

号特願参照：発明の名称「微生物によるオロボールの製造法」。化合物(I)，即ち、糖の定量はD.D.Cの比色法を測定することによつて定数できる。D.D.C活性測定はアワバウ等の方法(J. Biol. Chem.; 235, 126, 1960)に従つて測定されるが詳細は下記のとくである。

1-ドーパ 1×10^{-2} モル/l、ピリドキサルリン酸 7.5×10^{-2} モル/l、ドーパデカルボキシラーゼ（この条件下でOD278mμ=0.2を得る酵素量、通常、蛋白質1mg/ml）0.05ml、リ

11

知に基づいて、培養液中の液体部分に存在している、これら化合物はpH 2.0でブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に抽出される。一方、液体中の化合物(I)，即ち、糖は水と混じる有機溶剤、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、等て抽出し、酢酸ブチルによつて蒸留し、これをpH 8.0のアルカリ水に溶解し、不溶部分をのぞいたのち、培養液と同様に溶解液を酸性(pH 2.0)に調整後ブタノール、酢酸ブチル、酢酸エチル等に抽出し、培養液から化合物(I)，即ち、糖を抽出した溶剤と混合して濃縮液を得る。

上記の濃縮液を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、クロロフォルム：メタノール50：1の混合溶剤で溶出するとD.D.C活性を有する5つの分画にわけられる。すなわち、フラクション80~90にウーファクトリグニン〔化合物(II)〕、フラクション95~98にグニスチエイン、フラクション55~75に新化合物(III)、フラクション70~80にオロボルが、最後のフラクション100~120に8-ハイドロキシゲ

13

特開昭50-160483(4)

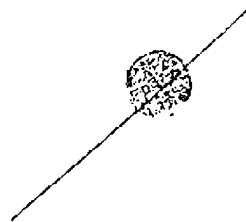
ン酸銀溶液(pH 8.9)0.03モル/l、インプロニアジド(IPRONIAZID) 1×10^{-2} モル/lを合わせ、水で全容1.8mlとする。この混合液を37℃、25分間反応させ、初製するドーパミンを陽イオン交換樹脂アンバライト00-20(ロームアンドハース社製)アンモニウムに吸着させ、水洗後、1%定酢酸で溶出し、紫外部279mμの吸収を測定した。その値より生成ドーパミン量を定数し、収率を求めた。

次に化合物(I)，即ち、糖の抽出、精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ水、メタノール、エタノールアセトン等に溶けてよく溶解し、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等にも溶解する。培養液中のこれら化合物は吸着でブタノール、酢酸ブチル等で抽出される。これら化合物は熱に安定であり、100℃3分間の加熱により、活性は低下しない。又60℃30分間の加熱で、pH 2.0、7.0、8.0で安定である。また化合物(I)，即ち、糖はpH 2.0で酢酸ブチルに溶解することから、これら化合物は昇酸性物質である。この性

12

ニステエイン〔化合物(II)〕が抽出分離される。これらのインフラボン誘導体のそれぞれを蒸留・濃縮し、メタノールに溶解し、セフアグクx1H-20等により精製する。更にその活性部をシリカゲル(00-7-200~225メフシェーミングクロット)等のクロマトグラフィーを利用して、精製できる。化合物(I)，即ち、糖は過剰を蒸留、例えばベンゼンから新品化される。

次に本発明によつて明らかにされた化合物(II)，即ち、糖の理化学的性状、及び生物学的性状について記載する。



26

A) 化合物(I), (II), (III)の理化学的性質

本実験によつて得られる化合物(I)は、黄褐色の、結状固体であり、25℃で溶融分解する。元素分析の結果の一例はC: 60.43%, H: 3.86%, O: 35.39%で計算及び他の元素は含まれない。マスマスペクトルグラフィーで $m/e=316$ が与えられ、 $C_{16}H_{12}O_4$ の分子式を有する。なお、 $C_{16}H_{12}O_4$ の分子式を有する化合物の元素分析の理論値は、C: 60.76%, H: 3.82%, O: 35.41%である。又、化合物(II)はアルカリ水、メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド等によく溶解するが、ベンゼン、クロロホルム、トルエン等には溶けにくい。

紫外線吸収スペクトル曲線では、メタノール溶液中で268 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 960$), 295 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 360$)に吸収極大を有する。又、0.01規定塩酸を含む酸性メタノール溶液中では、268 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 680$), 295 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 360$)に吸収極大を、0.01規定水酸化ナトリウムを含む

15

塩酸のプロトンがあり、カップリングをしている。更に、8.58 ppmに芳香族性のプロトンが1個存在する。4.58 ppmにメトキシ基1個が存在する。又、オーバーハウザー効果の測定により、メトキシ基は8位に結合していることが示唆された。

ジメチル硫酸でメチル化を行なうと、4個のメチル基が導入され、テトラメチル体を得られる。このメチル体のメトキシ基に就いて、オーバーハウザー効果を測定するとにより、置換基の位置が3', 4', 5, 7, 8位であることが決定された。又、無水酢酸でアセチル化すると、アセチル基が4個導入され、テトラアセチル体を得ることができた。これにより、フェノール基の水酸基が4個存在することが決定された。更にこのアセチル体を経クロロホルムに溶かし100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルを検討することにより、このアセチル体のB環のプロトンのカップリングの様式が明らかになった。これによりB環の置換様式は1, 2, 4置換様式であることが決定された。

17

特開 150-160483(5)

むアルカリ性メタノール溶液中では279 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 660$), 345 mμ ($\epsilon \frac{1}{cm} = 420$)に吸収極大を示す。

臭化カリウムとして紫外線吸収スペクトルを測定すると、波数340, 1680, 1530, 1450, 1380, 1270, 1240, 1180, 1115, 1065, 1035, 995, 910, 865, 830, 780, 750, 680 cm^{-1} に吸収が見られる。

定性反応は、縮化第二鉄反応、2,6-ジクロロキノンクロロイミド反応、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン反応は陽性、エールリッヒ反応、エンヒドリン反応は陰性である。シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは、クロロホルム:メタノール10:1でRf値0.36、酢酸エチル:メタノール20:1でRf値0.70である。

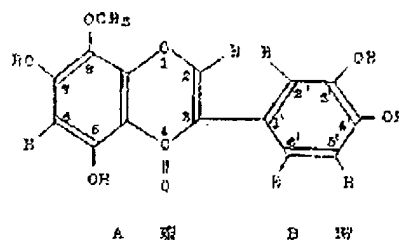
この化合物(II)の100メガヘルツの核磁気共鳴スペクトルに於いて、重アセトン中で8.30付近に水素結合した水酸基の2個のプロトン、8.20にイソフラボン骨格のプロトンが1個、8.7.1 ppm、6.9 ppmにそれぞれ2個と2個の芳香

16

すなわち、B環の置換基の位置は、1', 3', 4'位であることが決定された。

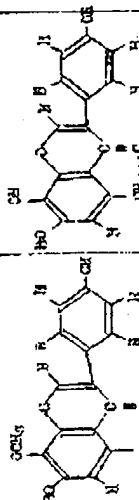
紫外線吸収の極大が臭化アルミニウムの添加により14 mμ 長波長にシフトすることにより、5位に水酸基が、加酸ソーダ添加により2.1 mμ 長波長にシフトすることにより、7位にそれぞれ水酸基が存在することが決定された。

以上の結果により、化合物(II)の構造式を有するとともに、3', 4', 5, 7-テトラハイドロキシ-8-メトキシイソフラボンであると決定した。



化合物(III)の構造は化合物(II)の構造を決定し

| | | |
|------------|--|--|
| 形 状 | 黄色粉末 | 黄色粉末 |
| 融 点 | 245℃ | 250℃ |
| 元素分析 | C: 64.35 H: 4.08 N: 31.57 | |
| 理論値 | C: 64.00 H: 4.03 N: 31.97 | |
| 分子式 | C ₁₀ H ₈ N ₂ | C ₁₀ H ₈ N ₂ |
| アスベクトル | 300 | 200 |
| 紫外部 | 260mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.07), 290mμ (A _{1%} ^{1cm} = 0.15), 310mμ (A _{1%} ^{1cm} = 0.15) | 272mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.15), 310mμ (A _{1%} ^{1cm} = 0.15) |
| 吸収スペクトル | 0.01% 溶液 (25℃) 285mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.05), 305mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.05), 325mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.05) | 272mμ (E _{1%} ^{1cm} = 0.15), 310mμ (A _{1%} ^{1cm} = 0.15) |
| 赤外線吸収スペクトル | 3.0μ (強), 3.4μ (中), 3.6μ (弱), 3.8μ (弱), 4.2μ (弱), 4.6μ (弱), 5.2μ (弱), 5.8μ (弱), 6.2μ (弱), 6.8μ (弱), 7.2μ (弱), 7.8μ (弱), 8.2μ (弱), 8.8μ (弱), 9.2μ (弱), 9.8μ (弱), 10.2μ (弱), 10.8μ (弱), 11.2μ (弱), 11.8μ (弱), 12.2μ (弱), 12.8μ (弱), 13.2μ (弱), 13.8μ (弱), 14.2μ (弱), 14.8μ (弱), 15.2μ (弱), 15.8μ (弱), 16.2μ (弱), 16.8μ (弱), 17.2μ (弱), 17.8μ (弱), 18.2μ (弱), 18.8μ (弱), 19.2μ (弱), 19.8μ (弱), 20.2μ (弱), 20.8μ (弱), 21.2μ (弱), 21.8μ (弱), 22.2μ (弱), 22.8μ (弱), 23.2μ (弱), 23.8μ (弱), 24.2μ (弱), 24.8μ (弱), 25.2μ (弱), 25.8μ (弱), 26.2μ (弱), 26.8μ (弱), 27.2μ (弱), 27.8μ (弱), 28.2μ (弱), 28.8μ (弱), 29.2μ (弱), 29.8μ (弱), 30.2μ (弱), 30.8μ (弱), 31.2μ (弱), 31.8μ (弱), 32.2μ (弱), 32.8μ (弱), 33.2μ (弱), 33.8μ (弱), 34.2μ (弱), 34.8μ (弱), 35.2μ (弱), 35.8μ (弱), 36.2μ (弱), 36.8μ (弱), 37.2μ (弱), 37.8μ (弱), 38.2μ (弱), 38.8μ (弱), 39.2μ (弱), 39.8μ (弱), 40.2μ (弱), 40.8μ (弱), 41.2μ (弱), 41.8μ (弱), 42.2μ (弱), 42.8μ (弱), 43.2μ (弱), 43.8μ (弱), 44.2μ (弱), 44.8μ (弱), 45.2μ (弱), 45.8μ (弱), 46.2μ (弱), 46.8μ (弱), 47.2μ (弱), 47.8μ (弱), 48.2μ (弱), 48.8μ (弱), 49.2μ (弱), 49.8μ (弱), 50.2μ (弱), 50.8μ (弱), 51.2μ (弱), 51.8μ (弱), 52.2μ (弱), 52.8μ (弱), 53.2μ (弱), 53.8μ (弱), 54.2μ (弱), 54.8μ (弱), 55.2μ (弱), 55.8μ (弱), 56.2μ (弱), 56.8μ (弱), 57.2μ (弱), 57.8μ (弱), 58.2μ (弱), 58.8μ (弱), 59.2μ (弱), 59.8μ (弱), 60.2μ (弱), 60.8μ (弱), 61.2μ (弱), 61.8μ (弱), 62.2μ (弱), 62.8μ (弱), 63.2μ (弱), 63.8μ (弱), 64.2μ (弱), 64.8μ (弱), 65.2μ (弱), 65.8μ (弱), 66.2μ (弱), 66.8μ (弱), 67.2μ (弱), 67.8μ (弱), 68.2μ (弱), 68.8μ (弱), 69.2μ (弱), 69.8μ (弱), 70.2μ (弱), 70.8μ (弱), 71.2μ (弱), 71.8μ (弱), 72.2μ (弱), 72.8μ (弱), 73.2μ (弱), 73.8μ (弱), 74.2μ (弱), 74.8μ (弱), 75.2μ (弱), 75.8μ (弱), 76.2μ (弱), 76.8μ (弱), 77.2μ (弱), 77.8μ (弱), 78.2μ (弱), 78.8μ (弱), 79.2μ (弱), 79.8μ (弱), 80.2μ (弱), 80.8μ (弱), 81.2μ (弱), 81.8μ (弱), 82.2μ (弱), 82.8μ (弱), 83.2μ (弱), 83.8μ (弱), 84.2μ (弱), 84.8μ (弱), 85.2μ (弱), 85.8μ (弱), 86.2μ (弱), 86.8μ (弱), 87.2μ (弱), 87.8μ (弱), 88.2μ (弱), 88.8μ (弱), 89.2μ (弱), 89.8μ (弱), 90.2μ (弱), 90.8μ (弱), 91.2μ (弱), 91.8μ (弱), 92.2μ (弱), 92.8μ (弱), 93.2μ (弱), 93.8μ (弱), 94.2μ (弱), 94.8μ (弱), 95.2μ (弱), 95.8μ (弱), 96.2μ (弱), 96.8μ (弱), 97.2μ (弱), 97.8μ (弱), 98.2μ (弱), 98.8μ (弱), 99.2μ (弱), 99.8μ (弱), 100.2μ (弱), 100.8μ (弱), 101.2μ (弱), 101.8μ (弱), 102.2μ (弱), 102.8μ (弱), 103.2μ (弱), 103.8μ (弱), 104.2μ (弱), 104.8μ (弱), 105.2μ (弱), 105.8μ (弱), 106.2μ (弱), 106.8μ (弱), 107.2μ (弱), 107.8μ (弱), 108.2μ (弱), 108.8μ (弱), 109.2μ (弱), 109.8μ (弱), 110.2μ (弱), 110.8μ (弱), 111.2μ (弱), 111.8μ (弱), 112.2μ (弱), 112.8μ (弱), 113.2μ (弱), 113.8μ (弱), 114.2μ (弱), 114.8μ (弱), 115.2μ (弱), 115.8μ (弱), 116.2μ (弱), 116.8μ (弱), 117.2μ (弱), 117.8μ (弱), 118.2μ (弱), 118.8μ (弱), 119.2μ (弱), 119.8μ (弱), 120.2μ (弱), 120.8μ (弱), 121.2μ (弱), 121.8μ (弱), 122.2μ (弱), 122.8μ (弱), 123.2μ (弱), 123.8μ (弱), 124.2μ (弱), 124.8μ (弱), 125.2μ (弱), 125.8μ (弱), 126.2μ (弱), 126.8μ (弱), 127.2μ (弱), 127.8μ (弱), 128.2μ (弱), 128.8μ (弱), 129.2μ (弱), 129.8μ (弱), 130.2μ (弱), 130.8μ (弱), 131.2μ (弱), 131.8μ (弱), 132.2μ (弱), 132.8μ (弱), 133.2μ (弱), 133.8μ (弱), 134.2μ (弱), 134.8μ (弱), 135.2μ (弱), 135.8μ (弱), 136.2μ (弱), 136.8μ (弱), 137.2μ (弱), 137.8μ (弱), 138.2μ (弱), 138.8μ (弱), 139.2μ (弱), 139.8μ (弱), 140.2μ (弱), 140.8μ (弱), 141.2μ (弱), 141.8μ (弱), 142.2μ (弱), 142.8μ (弱), 143.2μ (弱), 143.8μ (弱), 144.2μ (弱), 144.8μ (弱), 145.2μ (弱), 145.8μ (弱), 146.2μ (弱), 146.8μ (弱), 147.2μ (弱), 147.8μ (弱), 148.2μ (弱), 148.8μ (弱), 149.2μ (弱), 149.8μ (弱), 150.2μ (弱), 150.8μ (弱), 151.2μ (弱), 151.8μ (弱), 152.2μ (弱), 152.8μ (弱), 153.2μ (弱), 153.8μ (弱), 154.2μ (弱), 154.8μ (弱), 155.2μ (弱), 155.8μ (弱), 156.2μ (弱), 156.8μ (弱), 157.2μ (弱), 157.8μ (弱), 158.2μ (弱), 158.8μ (弱), 159.2μ (弱), 159.8μ (弱), 160.2μ (弱), 160.8μ (弱), 161.2μ (弱), 161.8μ (弱), 162.2μ (弱), 162.8μ (弱), 163.2μ (弱), 163.8μ (弱), 164.2μ (弱), 164.8μ (弱), 165.2μ (弱), 165.8μ (弱), 166.2μ (弱), 166.8μ (弱), 167.2μ (弱), 167.8μ (弱), 168.2μ (弱), 168.8μ (弱), 169.2μ (弱), 169.8μ (弱), 170.2μ (弱), 170.8μ (弱), 171.2μ (弱), 171.8μ (弱), 172.2μ (弱), 172.8μ (弱), 173.2μ (弱), 173.8μ (弱), 174.2μ (弱), 174.8μ (弱), 175.2μ (弱), 175.8μ (弱), 176.2μ (弱), 176.8μ (弱), 177.2μ (弱), 177.8μ (弱), 178.2μ (弱), 178.8μ (弱), 179.2μ (弱), 179.8μ (弱), 180.2μ (弱), 180.8μ (弱), 181.2μ (弱), 181.8μ (弱), 182.2μ (弱), 182.8μ (弱), 183.2μ (弱), 183.8μ (弱), 184.2μ (弱), 184.8μ (弱), 185.2μ (弱), 185.8μ (弱), 186.2μ (弱), 186.8μ (弱), 187.2μ (弱), 187.8μ (弱), 188.2μ (弱), 188.8μ (弱), 189.2μ (弱), 189.8μ (弱), 190.2μ (弱), 190.8μ (弱), 191.2μ (弱), 191.8μ (弱), 192.2μ (弱), 192.8μ (弱), 193.2μ (弱), 193.8μ (弱), 194.2μ (弱), 194.8μ (弱), 195.2μ (弱), 195.8μ (弱), 196.2μ (弱), 196.8μ (弱), 197.2μ (弱), 197.8μ (弱), 198.2μ (弱), 198.8μ (弱), 199.2μ (弱), 199.8μ (弱), 200.2μ (弱), 200.8μ (弱), 201.2μ (弱), 201.8μ (弱), 202.2μ (弱), 202.8μ (弱), 203.2μ (弱), 203.8μ (弱), 204.2μ (弱), 204.8μ (弱), 205.2μ (弱), 205.8μ (弱), 206.2μ (弱), 206.8μ (弱), 207.2μ (弱), 207.8μ (弱), 208.2μ (弱), 208.8μ (弱), 209.2μ (弱), 209.8μ (弱), 210.2μ (弱), 210.8μ (弱), 211.2μ (弱), 211.8μ (弱), 212.2μ (弱), 212.8μ (弱), 213.2μ (弱), 213.8μ (弱), 214.2μ (弱), 214.8μ (弱), 215.2μ (弱), 215.8μ (弱), 216.2μ (弱), 216.8μ (弱), 217.2μ (弱), 217.8μ (弱), 218.2μ (弱), 218.8μ (弱), 219.2μ (弱), 219.8μ (弱), 220.2μ (弱), 220.8μ (弱), 221.2μ (弱), 221.8μ (弱), 222.2μ (弱), 222.8μ (弱), 223.2μ (弱), 223.8μ (弱), 224.2μ (弱), 224.8μ (弱), 225.2μ (弱), 225.8μ (弱), 226.2μ (弱), 226.8μ (弱), 227.2μ (弱), 227.8μ (弱), 228.2μ (弱), 228.8μ (弱), 229.2μ (弱), 229.8μ (弱), 230.2μ (弱), 230.8μ (弱), 231.2μ (弱), 231.8μ (弱), 232.2μ (弱), 232.8μ (弱), 233.2μ (弱), 233.8μ (弱), 234.2μ (弱), 234.8μ (弱), 235.2μ (弱), 235.8μ (弱), 236.2μ (弱), 236.8μ (弱), 237.2μ (弱), 237.8μ (弱), 238.2μ (弱), 238.8μ (弱), 239.2μ (弱), 239.8μ (弱), 240.2μ (弱), 240.8μ (弱), 241.2μ (弱), 241.8μ (弱), 242.2μ (弱), 242.8μ (弱), 243.2μ (弱), 243.8μ (弱), 244.2μ (弱), 244.8μ (弱), 245.2μ (弱), 245.8μ (弱), 246.2μ (弱), 246.8μ (弱), 247.2μ (弱), 247.8μ (弱), 248.2μ (弱), 248.8μ (弱), 249.2μ (弱), 249.8μ (弱), 250.2μ (弱), 250.8μ (弱), 251.2μ (弱), 251.8μ (弱), 252.2μ (弱), 252.8μ (弱), 253.2μ (弱), 253.8μ (弱), 254.2μ (弱), 254.8μ (弱), 255.2μ (弱), 255.8μ (弱), 256.2μ (弱), 256.8μ (弱), 257.2μ (弱), 257.8μ (弱), 258.2μ (弱), 258.8μ (弱), 259.2μ (弱), 259.8μ (弱), 260.2μ (弱), 260.8μ (弱), 261.2μ (弱), 261.8μ (弱), 262.2μ (弱), 262.8μ (弱), 263.2μ (弱), 263.8μ (弱), 264.2μ (弱), 264.8μ (弱), 265.2μ (弱), 265.8μ (弱), 266.2μ (弱), 266.8μ (弱), 267.2μ (弱), 267.8μ (弱), 268.2μ (弱), 268.8μ (弱), 269.2μ (弱), 269.8μ (弱), 270.2μ (弱), 270.8μ (弱), 271.2μ (弱), 271.8μ (弱), 272.2μ (弱), 272.8μ (弱), 273.2μ (弱), 273.8μ (弱), 274.2μ (弱), 274.8μ (弱), 275.2μ (弱), 275.8μ (弱), 276.2μ (弱), 276.8μ (弱), 277.2μ (弱), 277.8μ (弱), 278.2μ (弱), 278.8μ (弱), 279.2μ (弱), 279.8μ (弱), 280.2μ (弱), 280.8μ (弱), 281.2μ (弱), 281.8μ (弱), 282.2μ (弱), 282.8μ (弱), 283.2μ (弱), 283.8μ (弱), 284.2μ (弱), 284.8μ (弱), 285.2μ (弱), 285.8μ (弱), 286.2μ (弱), 286.8μ (弱), 287.2μ (弱), 287.8μ (弱), 288.2μ (弱), 288.8μ (弱), 289.2μ (弱), 289.8μ (弱), 290.2μ (弱), 290.8μ (弱), 291.2μ (弱), 291.8μ (弱), 292.2μ (弱), 292.8μ (弱), 293.2μ (弱), 293.8μ (弱), 294.2μ (弱), 294.8μ (弱), 295.2μ (弱), 295.8μ (弱), 296.2μ (弱), 296.8μ (弱), 297.2μ (弱), 297.8μ (弱), 298.2μ (弱), 298.8μ (弱), 299.2μ (弱), 299.8μ (弱), 300.2μ (弱), 300.8μ (弱), 301.2μ (弱), 301.8μ (弱), 302.2μ (弱), 302.8μ (弱), 303.2μ (弱), 303.8μ (弱), 304.2μ (弱), 304.8μ (弱), 305.2μ (弱), 305.8μ (弱), 306.2μ (弱), 306.8μ (弱), 307.2μ (弱), 307.8μ (弱), 308.2μ (弱), 308.8μ (弱), 309.2μ (弱), 309.8μ (弱), 310.2μ (弱), 310.8μ (弱), 311.2μ (弱), 311.8μ (弱), 312.2μ (弱), 312.8μ (弱), 313.2μ (弱), 313.8μ (弱), 314.2μ (弱), 314.8μ (弱), 315.2μ (弱), 315.8μ (弱), 316.2μ (弱), 316.8μ (弱), 317.2μ (弱), 317.8μ (弱), 318.2μ (弱), 318.8μ (弱), 319.2μ (弱), 319.8μ (弱), 320.2μ (弱), 320.8μ (弱), 321.2μ (弱), 321.8μ (弱), 322.2μ (弱), 322.8μ (弱), 323.2μ (弱), 323.8μ (弱), 324.2μ (弱), 324.8μ (弱), 325.2μ (弱), 325.8μ (弱), 326.2μ (弱), 326.8μ (弱), 327.2μ (弱), 327.8μ (弱), 328.2μ (弱), 328.8μ (弱), 329.2μ (弱), 329.8μ (弱), 330.2μ (弱), 330.8μ (弱), 331.2μ (弱), 331.8μ (弱), 332.2μ (弱), 332.8μ (弱), 333.2μ (弱), 333.8μ (弱), 334.2μ (弱), 334.8μ (弱), 335.2μ (弱), 335.8μ (弱), 336.2μ (弱), 336.8μ (弱), 337.2μ (弱), 337.8μ (弱), 338.2μ (弱), 338.8μ (弱), 339.2μ (弱), 339.8μ (弱), 340.2μ (弱), 340.8μ (弱), 341.2μ (弱), 341.8μ (弱), 342.2μ (弱), 342.8μ (弱), 343.2μ (弱), 343.8μ (弱), 344.2μ (弱), 344.8μ (弱), 345.2μ (弱), 345.8μ (弱), 346.2μ (弱), 346.8μ (弱), 347.2μ (弱), 347.8μ (弱), 348.2μ (弱), 348.8μ (弱), 349.2μ (弱), 349.8μ (弱), 350.2μ (弱), 350.8μ (弱), 351.2μ (弱), 351.8μ (弱), 352.2μ (弱), 352.8μ (弱), 353.2μ (弱), 353.8μ (弱), 354.2μ (弱), 354.8μ (弱), 355.2μ (弱), 355.8μ (弱), 356.2μ (弱), 356.8μ (弱), 357.2μ (弱), 357.8μ (弱), 358.2μ (弱), 358.8μ (弱), 359.2μ (弱), 359.8μ (弱), 360.2μ (弱), 360.8μ (弱), 361.2μ (弱), 361.8μ (弱), 362.2μ (弱), 362.8μ (弱), 363.2μ (弱), 363.8μ (弱), 364.2μ (弱), 364.8μ (弱), 365.2μ (弱), 365.8μ (弱), 366.2μ (弱), 366.8μ (弱), 367.2μ (弱), 367.8μ (弱), 368.2μ (弱), 368.8μ (弱), 369.2μ (弱), 369.8μ (弱), 370.2μ (弱), 370.8μ (弱), 371.2μ (弱), 371.8μ (弱), 372.2μ (弱), 372.8μ (弱), 373.2μ (弱), 373.8μ (弱), 374.2μ (弱), 374.8μ (弱), 375.2μ (弱), 375.8μ (弱), 376.2μ (弱), 376.8μ (弱), 377.2μ (弱), 377.8μ (弱), 378.2μ (弱), 378.8μ (弱), 379.2μ (弱), 379.8μ (弱), 380.2μ (弱), 380.8μ (弱), 381.2μ (弱), 381.8μ (弱), 382.2μ (弱), 382.8μ (弱), 383.2μ (弱), 383.8μ (弱), 384.2μ (弱), 384.8μ (弱), 385.2μ (弱), 385.8μ (弱), 386.2μ (弱), 386.8μ (弱), 387.2μ (弱), 387.8μ (弱), 388.2μ (弱), 388.8μ (弱), 389.2μ (弱), 389.8μ (弱), 390.2μ (弱), 390.8μ (弱), 391.2μ (弱), 391.8μ (弱), 392.2μ (弱), 392.8μ (弱), 393.2μ (弱), 393.8μ (弱), 394.2μ (弱), 394.8μ (弱), 395.2μ (弱), 395.8μ (弱), 396.2μ (弱), 396.8μ (弱), 397.2μ (弱), 397.8μ (弱), 398.2μ (弱), 398.8μ (弱), 399.2μ (弱), 399.8μ (弱), 400.2μ (弱), 400.8μ (弱), 401.2μ (弱), 401.8μ (弱), 402.2μ (弱), 402.8μ (弱), 403.2μ (弱), 403.8μ (弱), 404.2μ (弱), 404.8μ (弱), 405.2μ (弱), 405.8μ (弱), 406.2μ (弱), 406.8μ (弱), 407.2μ (弱), 407.8μ (弱), 408.2μ (弱), 408.8μ (弱), 409.2μ (弱), 409.8μ (弱), 410.2μ (弱), 410.8μ (弱), 411.2μ (弱), 411.8μ (弱), 412.2μ (弱), 412.8μ (弱), 413.2μ (弱), 413.8μ (弱), 414.2μ (弱), 414.8μ (弱), 415.2μ (弱), 415.8μ (弱), 416.2μ (弱), 416.8μ (弱), 417.2μ (弱), 417.8μ (弱), 418.2μ (弱), 418.8μ (弱), 419.2μ (弱), 419.8μ (弱), 420.2μ (弱), 420.8μ (弱), 421.2μ (弱), 421.8μ (弱), 422.2μ (弱), 422.8μ (弱), 423.2μ (弱), 423.8μ (弱), 424.2μ (弱), 424.8μ (弱), 425.2μ (弱), 425.8μ (弱), 426.2μ (弱), 426.8μ (弱), 427.2μ (弱), 427.8μ (弱), 428.2μ (弱), 428.8μ (弱), 429.2μ (弱), 429.8μ (弱), 430.2μ (弱), 430.8μ (弱), 431.2μ (弱), 431.8μ (弱), 432.2μ (弱), 432.8μ (弱), 433.2μ (弱), 433.8μ (弱), 434.2μ (弱), 434.8μ (弱), 435.2μ (弱), 435.8μ (弱), 436.2μ (弱), 436.8μ (弱), 437.2μ (弱), 437.8μ (弱), 438.2μ (弱), 438.8μ (弱), 439.2μ (弱), 439.8μ (弱), 440.2μ (弱), 440.8μ (弱), 441.2μ (弱), 441.8μ (弱), 442.2μ (弱), 442.8μ (弱), 443.2μ (弱), 443.8μ (弱), 444.2μ (弱), 444.8μ (弱), 445.2μ (弱), 445.8μ (弱), 446.2μ (弱), 446.8μ (弱), 447.2μ (弱), 447.8μ (弱), 448.2μ (弱), 448.8μ (弱), 449.2μ (弱), 449.8μ (弱), 450.2μ (弱), 450.8μ (弱), 451.2μ (弱), 451.8μ (弱), 452.2μ (弱), 452.8μ (弱), 453.2μ (弱), 453.8μ (弱), 454.2μ (弱), 454.8μ (弱), 455.2μ (弱), 455.8μ (弱), 456.2μ (弱), 456.8μ (弱), 457.2μ (弱), 457.8μ (弱), 458.2μ (弱), 458.8μ (弱), 459.2μ (弱), 459.8μ (弱), 460.2μ (弱), 460.8μ (弱), 461.2μ (弱), 461.8μ (弱), 462.2μ (弱), 462.8μ (弱), 463.2μ (弱), 463.8μ (弱), 464.2μ (弱), 464.8μ (弱), 465.2μ (弱), 465.8μ (弱), 466.2μ (弱), 466.8μ (弱), 467.2μ (弱), 467.8μ (弱), 468.2μ (弱), 468.8μ (弱), 469.2μ (弱), 469.8μ (弱), 470.2μ (弱), 470.8μ (弱), 471.2μ (弱), 471.8μ (弱), 472.2μ (弱), 472.8μ (弱), 473.2μ (弱), 473.8μ (弱), 474.2μ (弱), 474.8μ (弱), 475.2μ (弱), 475.8μ (弱), 476.2μ (弱), 476.8μ (弱), 477.2μ (弱), 477.8μ (弱), 478.2μ (弱), 478.8μ (弱), 479.2μ (弱), 479.8μ (弱), 480.2μ (弱), 480.8μ (弱), 481.2μ (弱), 481.8μ (弱), 482.2μ (弱), 482.8μ (弱), 483.2μ (弱), 483.8μ (弱), 484.2μ (弱), 484.8μ (弱), 485.2μ (弱), 485.8μ (弱), 486.2μ (弱), 486.8μ (弱), 487.2μ (弱), 487.8μ (弱), 488.2μ (弱), 488.8μ (弱), 489.2μ (弱), 489.8μ (弱), 490.2μ (弱), 490.8μ (弱), 491.2μ (弱), 491.8μ (弱), 492.2μ (弱), 492.8μ (弱), 493.2μ (弱), 493.8μ (弱), 494.2μ (弱), 494.8μ (弱), 495.2μ (弱), 495.8μ (弱), 496.2μ (弱), 496.8μ (弱), 497.2μ (弱), 497.8μ (弱), 498.2μ (弱), 498.8μ (弱), 499.2μ (弱), 499.8μ (弱), 500.2μ (弱), 500.8μ (弱), 501.2μ (弱), 501.8μ (弱), 502.2μ (弱), 502.8μ (弱), 503.2μ (弱), 503.8μ (弱), 504.2μ (弱), 504.8μ (弱), 505.2μ (弱), 505.8μ (弱), 506.2μ (弱), 506.8μ (弱), 507.2μ (弱), 507.8μ (弱), 508.2μ (弱), 508.8μ (弱), 509.2μ (弱), 509.8μ (弱), 510.2μ (弱), 510.8μ (弱), 511.2μ (弱), 511.8μ (弱), 512.2μ (弱), 512.8μ (弱), 513.2μ (弱), 513.8μ (弱), 514.2μ (弱), 514.8μ (弱), 515.2μ (弱), 515.8μ (弱), 516.2μ (弱), 516.8μ (弱), 517.2μ (弱), 517.8μ (弱), 518.2μ (弱), 518.8μ (弱), 519.2μ (弱), 519.8μ (弱), 520.2μ (弱), 520.8μ (弱), 521.2μ (弱), 521.8μ (弱), 522.2μ (弱), 522.8μ (弱), 523.2μ (弱), 523.8μ (弱), 524.2μ (弱), 524.8μ (弱), 525.2μ (弱), 525.8μ (弱), 526.2μ (弱), 526.8μ (弱), 527.2μ (弱), 527.8μ (弱), 528.2μ (弱), 528.8μ (弱), 529.2μ (弱), 529.8μ (弱), 530.2μ (弱), 530.8μ (弱), 531.2μ (弱), 531.8μ (弱), 532.2μ (弱), 532.8μ (弱), 533.2μ (弱), 533.8μ (弱), 534.2μ (弱), 534.8μ (弱), 535.2μ (弱), 535.8μ (弱), 536.2μ (弱), 536.8μ (弱), 537.2μ (弱), 537.8μ (弱), 538.2μ (弱), 538.8μ (弱), 539.2μ (弱), 539.8μ (弱), 540.2μ (弱), 540.8μ (弱), 541.2μ (弱), 541.8μ (弱), 542.2μ (弱), 542.8μ (弱), 543.2μ (弱), 543.8μ (弱), 544.2μ (弱), 544.8μ (弱), 545.2μ (弱), 545.8μ (弱), 546.2μ (弱), 546.8μ (弱), 547.2μ (弱), 547.8μ (弱), 548.2μ (弱), 548.8μ (弱), 549.2μ (弱), 549.8μ (弱), 550.2μ (弱), 550.8μ (弱), 551.2μ (弱), 551.8μ (弱), 552.2μ (弱), 552.8μ (弱), 553.2μ (弱), 553.8μ (弱), 554.2μ (弱), 554.8μ (弱), 555.2μ (弱), 555.8μ (弱), 556.2μ (弱), 556.8μ (弱), 557.2μ (弱), 557.8μ (弱), 558.2μ (弱), 558.8μ (弱), 559.2μ (弱), 559.8μ (弱), 560.2μ (弱), 560.8μ (弱), 561.2μ (弱), 561.8μ (弱), 562.2μ (弱), 562.8μ (弱), 563.2μ (弱), 563.8μ (弱), 564.2μ (弱), 564.8μ (弱), 565.2μ (弱), 565.8μ (弱), 566.2μ (弱), 566.8μ (弱), 567.2μ (弱), 567.8μ (弱), 568.2μ (弱), 568.8μ (弱), 569.2μ (弱), 569.8μ (弱), 570.2μ (弱), 570.8μ (弱), 571.2μ (弱), 571.8μ (弱), 572.2μ (弱), 572.8μ (弱), 573.2μ (弱), 573.8μ (弱), 574.2μ (弱), 574.8μ (弱), 575.2μ (弱), 575.8μ (弱), 576.2μ (弱), 576.8μ (弱), 577.2μ (弱), 577.8μ (弱), 578.2μ (弱), 578.8μ (弱), 579.2μ (弱), 579.8μ (弱), 580.2μ (弱), 580.8μ (弱), 581.2μ (弱), 581.8μ (弱), 582.2μ (弱), 582.8μ (弱), 583.2μ (弱), 583.8μ (弱), 584.2μ (弱), 584.8μ (弱), 585.2μ (弱), 585.8μ (弱), 586.2μ (弱), 586.8μ (弱), 587.2μ (弱), 587.8μ (弱), 588.2μ (弱), 588.8μ (弱), 589.2μ (弱), 589.8μ (弱), 590.2μ (弱), 590.8μ (弱), 591.2μ (弱), 591.8μ (弱), 592.2μ (弱), 592.8μ (弱), 593.2μ (弱), 593.8μ (弱), 594.2μ (弱), 594.8μ (弱), 595.2μ (弱), 595.8μ (弱), 596.2μ (弱), 596.8μ (弱), 597.2μ (弱), 597.8μ (弱), 598.2μ (弱), 598.8μ (弱), 599.2μ (弱), 599.8μ (弱), 600.2μ (弱), 600.8μ (弱), 601.2μ | |



h) 化合物(I), (II), (III) の生物学的性状

a) 化合物(I), (II), (III) の毒性は85%ジメチルホルムアミド水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したときいずれの化合物も250mg/kgで毒性を示さなかつた。

b) 化合物(I), (II), (III) の各種酵素活性に対する阻害活性、(4) D.D.C の阻害活性は前述の方法で測定した時の化合物(I), (II), (III) の50%阻害濃度はそれぞれ表3に示したとおりであつた。

表 3

| 化合物名 | D.D.C の50%阻害濃度 |
|------|--|
| I | 3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($8.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) |
| II | 51.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1.27 \times 10^{-4} \text{ M}$) |
| III | 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($9.1 \times 10^{-8} \text{ M}$) |

(4) H.D.C の阻害活性は下記に示す方法に示したがつて測定した。すなわちヒ-ヒスチジン-2-¹⁴C ($1.0 \times 10^5 \text{ cpm}$) を $5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、ピリドキサルリン酸 $5.7 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、ヒスチジンデカル

21

et al.; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 174, 83-88, 1970) のように測定した時の化合物(I), (II), (III) のCOMTの50%阻害活性は表4に示したとおりであつた。

表 4

| 化合物名 | COMTの50%阻害濃度 |
|------|--|
| I | 6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) |
| II | 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$) |
| III | 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($3.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) |

(4) エストラジオールに特異的に結合する子宮頸癌に対する結合阻害活性測定法は、スタンレイの方法 (G.K. Stanley; Journal Clinical Endocrinol and Metabolism 28, 127, 1968) に準じて測定した。エストラジオールが結合するのを50%阻害する化合物(I), (II), (III) の濃度は表5に示したとおりであつた。

25

23

特開 昭50-160483 (7)

メキシラーゼ (50% 1 mg/ml) 0.1 ml、リン酸緩衝液 (pH 6.6) 0.057 M の混合液に 0.1 ml の検定する試料を入れ、脱イオン水で全容を 2.0 ml とし、37°C で2時間反応させ、生成したヒスタミン-2-¹⁴C をアンバーライト CO-80 アンモニア型に吸着させ、水洗後、1 M アンモニア水で、生成ヒスタミンを洗脱させ、プレートのシンチレータを8%加え、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、作図ヒスタミン量を求める。このように測定したときの化合物(I), (II), (III) のH.D.Cの50%阻害活性は表5に示した。

表 5

| 化合物名 | H.D.C の50%阻害濃度 |
|------|---|
| I | 5.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$) |
| II | 39.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1.3 \times 10^{-4} \text{ M}$) |
| III | 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) |

(4) COMTの阻害活性はニコデジエビツク等が報告した方法に準じて測定した。(D. Sirode Jayio

22

表 5

| 化合物名 | 50%阻害濃度 |
|------|---|
| I | 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($6.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) |
| II | 2.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($9.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) |
| III | >20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($>7.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) |

本発明により新規化合物(I)および化合物(II), (III) が糸状菌の微生物によつて作られることが明らかになつたので、この明細書に記載された知見に基づいて、本明細書に記載された方法を修飾した方法が容易に想到される。修飾阻害剤の生産は特定の菌種に限らない。他の糸状菌を用いてこれを生産することは、専門家にとつて容易なことである。本発明はそのすべての修飾方法を含括し、以下に示す実施例はその例示であつて、本発明は狭義に限定されるものではない。

実施例 1

アスペルギルス・ニガー NRRL 3182 株 (農工研研第2063号) をポラトデキストロース寒天斜面培地に14日間生育させ、そこから一白金

24

原料を馬鈴薯デンプン 8 部、グルコーズ 1 部、ソイビーンミール 2 部、 KH_2PO_4 0.1 部、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 部を含む培地 1.5 ml を 500 ml 容位の瓶とフラスコに分注し、 22°C で 20 分間振盪したものに移殖し、 27°C で毎分 130 回転の振とうで 5 日間培養した。DE は培養前 6.0、1 日後 5.6、2 日後 5.0、3 日後 5.2、4 日後 5.0、5 日後 4.2 であった。

上記 5 日間培養後の培養液は 1 ml 中 1 mg の濃度の化合物印を、化合物印を 0.3 mg、グニステアイン 0.1 mg、D-ハイドロキシゲニステアイン 0.06 mg を含有していた。又培養液 10 ml より得られる固体は 5 ml のメタノールを加えインフラポン装置を有する化合物を抽出した。このメタノール溶液 1 ml 中には化合物印は 2 mg、化合物印は 0.5 mg、グニステアインは 0.1 mg、化合物印は 0.06 mg 含まれていた。この培養液 10 ml を蒸留して清澄な溶液 9 ml と固体固形物 1.8 mg が得られた。培養液は 2 M-塩酸で pH 2.0 とし、4.5 ml の酢酸ブチルで 3 回抽出した。固体固形物

25

凝された。このシリカゲルのクロマトグラフィーにより、フラクション 20~30 に化合物印が 2.5~5.5 にグニステアイン、5.5~7.5 に化合物印、7.5~8.0 にオロゲル、8.0~12.0 に化合物印が、それぞれ得出された。それぞれの活性部分をあつめ減圧下に乾燥乾燥した後、それぞれを 5 ml のメタノールに溶解し、メタノールで蒸発させたセフアデクサス 1.8~2.0 を充填した 2 cm x 200 cm の管に装せ、メタノールにより洗脱し D.D.C 阻害活性分画をあつめ乾燥乾燥した。この乾燥物をさらに精製する目的でそれぞれを 10 ml のメタノールに溶解し、それぞれにシリカゲル (マリンクロツト社製シリシリツク 4R00-7, 200~250 mesh マッシュ) 10 g を加えて減圧乾燥乾燥し、これを、クロロホルム:メタノール (100:1) の溶媒系で上記と同じシリカゲル 40 g をゲル化させ 5.2 cm x 30 cm の系につめ、その上端に乾燥物をのせ上記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行くと、それぞれ精製された 1 つのピークとなつた。この活性部分を集め減圧

27

28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648
 649
 650
 651
 652
 653
 654
 655
 656
 657
 658
 659
 660
 661
 662
 663
 664
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676
 677
 678
 679
 680
 681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688
 689
 690
 691
 692
 693
 694
 695
 696
 697
 698
 699
 700
 701
 702
 703
 704
 705
 706
 707
 708
 709
 710
 711
 712
 713
 714
 715
 716
 717
 718
 719
 720
 721
 722
 723
 724
 725
 726
 727
 728
 729
 730
 731
 732
 733
 734
 735
 736
 737
 738
 739
 740
 741
 742
 743
 744
 745
 746
 747
 748
 749
 750
 751
 752
 753
 754
 755
 756
 757
 758
 759
 760
 761
 762
 763
 764
 765
 766
 767
 768
 769
 770
 771
 772
 773
 774
 775
 776
 777
 778
 779
 780
 781
 782
 783
 784
 785
 786
 787
 788
 789
 790
 791
 792
 793
 794
 795
 796
 797
 798
 799
 800
 801
 802
 803
 804
 805
 806
 807
 808
 809
 810
 811
 812
 813
 814
 815
 816
 817
 818
 819
 820
 821
 822
 823
 824
 825
 826
 827
 828
 829
 830
 831
 832
 833
 834
 835
 836
 837
 838
 839
 840
 841
 842
 843
 844
 845
 846
 847
 848
 849
 850
 851
 852
 853
 854
 855
 856
 857
 858
 859
 860
 861
 862
 863
 864
 865
 866
 867
 868
 869
 870
 871
 872
 873
 874
 875
 876
 877
 878
 879
 880
 881
 882
 883
 884
 885
 886
 887
 888
 889
 890
 891
 892
 893
 894
 895
 896
 897
 898
 899
 900
 901
 902
 903
 904
 905
 906
 907
 908
 909
 910
 911
 912
 913
 914
 915
 916
 917
 918
 919
 920
 921
 922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935
 936
 937
 938
 939
 940
 941
 942
 943
 944
 945
 946
 947
 948
 949
 950
 951
 952
 953
 954
 955
 956
 957
 958
 959
 960
 961
 962
 963
 964
 965
 966
 967
 968
 969
 970
 971
 972
 973
 974
 975
 976
 977
 978
 979
 980
 981
 982
 983
 984
 985
 986
 987
 988
 989
 990
 991
 992
 993
 994
 995
 996
 997
 998
 999
 1000
 1001
 1002
 1003
 1004
 1005
 1006
 1007
 1008
 1009
 1010
 1011
 1012
 1013
 1014
 1015
 1016
 1017
 1018
 1019
 1020
 1021
 1022
 1023
 1024
 1025
 1026
 1027
 1028
 1029
 1030
 1031
 1032
 1033
 1034
 1035
 1036
 1037
 1038
 1039
 1040
 1041
 1042
 1043
 1044
 1045
 1046
 1047
 1048
 1049
 1050
 1051
 1052
 1053
 1054
 1055
 1056
 1057
 1058
 1059
 1060
 1061
 1062
 1063
 1064
 1065
 1066
 1067
 1068
 1069
 1070
 1071
 1072
 1073
 1074
 1075
 1076
 1077
 1078
 1079
 1080
 1081
 1082
 1083
 1084
 1085
 1086
 1087
 1088
 1089
 1090
 1091
 1092
 1093
 1094
 1095
 1096
 1097
 1098
 1099
 1100
 1101
 1102
 1103
 1104
 1105
 1106
 1107
 1108
 1109
 1110
 1111
 1112
 1113
 1114
 1115
 1116
 1117
 1118
 1119
 1120
 1121
 1122
 1123
 1124
 1125
 1126
 1127
 1128
 1129
 1130
 1131
 1132
 1133
 1134
 1135
 1136
 1137
 1138
 1139
 1140
 1141
 1142
 1143
 1144
 1145
 1146
 1147
 1148
 1149
 1150
 1151
 1152
 1153
 1154
 1155
 1156
 1157
 1158
 1159
 1160
 1161
 1162
 1163
 1164
 1165
 1166
 1167
 1168
 1169
 1170
 1171
 1172
 1173
 1174
 1175
 1176
 1177
 1178
 1179
 1180
 1181
 1182
 1183
 1184
 1185
 1186
 1187
 1188
 1189
 1190
 1191
 1192
 1193
 1194
 1195
 1196
 1197
 1198
 1199
 1200
 1201
 1202
 1203
 1204
 1205
 1206
 1207
 1208
 1209
 1210
 1211
 1212
 1213
 1214
 1215
 1216
 1217
 1218
 1219
 1220
 1221
 1222
 1223
 1224
 1225
 1226
 1227
 1228
 1229
 1230
 1231
 1232
 1233
 1234
 1235
 1236
 1237
 1238
 1239
 1240
 1241
 1242
 1243
 1244
 1245
 1246
 1247
 1248
 1249
 1250
 1251
 1252
 1253
 1254
 1255
 1256
 1257
 1258
 1259
 1260
 1261
 1262
 1263
 1264
 1265
 1266
 1267
 1268
 1269
 1270
 1271
 1272
 1273
 1274
 1275
 1276
 1277
 1278
 1279
 1280
 1281
 1282
 1283
 1284
 1285
 1286
 1287
 1288
 1289
 1290
 1291
 1292
 1293
 1294
 1295
 1296
 1297
 1298
 1299
 1300
 1301
 1302
 1303
 1304
 1305
 1306
 1307
 1308
 1309
 1310
 1311
 1312
 1313
 1314
 1315
 1316
 1317
 1318
 1319
 1320
 1321
 1322
 1323
 1324
 1325
 1326
 1327
 1328
 1329
 1330
 1331
 1332
 1333
 1334
 1335
 1336
 1337
 1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348
 1349
 1350
 1351
 1352
 1353
 1354
 1355
 1356
 1357
 1358
 1359
 1360
 1361
 1362
 1363
 1364
 1365
 1366
 1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388
 1389
 1390
 1391
 1392
 1393
 1394
 1395
 1396
 1397
 1398
 1399
 1400
 1401
 1402
 1403
 1404
 1405
 1406

この抽出率は85%であつた。固体部分にはメタノール0.5を加え、D.D.O 阻害活性物質をメタノールに抽出せしめ、このメタノールを分離し、減圧蒸餾することにより、20gのタール状物質を得た。この活性抽出率は70%であつた。原油及び固体から得たタール状物質をシリカゲル(100-フースペシャル-マリンクロツト)500gを充填したクロマト管で分離、精製し、D.D.O 阻害活性を有する5つの分画を得る。実験例1と同様にそれぞれをセフアデククスLH-25、100gのクロマトグラフィーで精製し、さらにシリカゲル(マリンクロツト社製シリシリツタA R 000-7 200~325メツシニ)500gを充填したクロマト管をもちいクロマトグラフィーを行ない精製し、メタノールベンゼンから結晶化させた。この場合は20.8gの化合物(I)、7.8gの化合物(II)、11.5gのゲニステエイン、0.2gのオロボル、5.2gの化合物(III)の結晶を得た。

実験例 8

エンタによる培養は実験例1と同様にして培養

した酵母を第1次酵母とし、実験例8と同様にして培養した酵母を第2次酵母として、200g容のステンレススチール製タンクに実験例1と同様の培養を150g仕込み、シリコン樹脂を0.01g加え12gで、30分間浸し、これに第2次酵母を5g接種し毎分200回転で撹拌し、2リットルで5日間培養した。この培養液をフィルタープレスで処理し220gの培養液と固体21gを得た。培養液は実験例1及び2と同様に減圧でpH 8.0となし酢酸ブチル0.05で5分間振盪中に含まれているD.D.O 阻害物質を抽出した。又固体固形部分に含まれるD.D.O 阻害物質の抽出は60gのメタノールを加え、かく拌、抽出、処理し、メタノール抽出液53gを得た。このメタノール溶液を減圧、蒸餾、乾固し、一酸化水酸化ナトリウムを加えつつ20gの水(pH 8.0)に溶解した。この溶液に酢酸を加え、pH 6.0となし、酢酸エチル6gで5分間抽出した。この酢酸ブチル抽出液は、培養液より抽出した酢酸ブチルとあわせ減圧蒸餾乾固し以後実験例1と同様の

状態で同様に精製し以下の量のインフラボン誘導体の結晶を得た。即ち化合物(I)を180mg、化合物(II)を10.2mg、ゲニステエインを100mg、オロボルを40.8mg、および化合物(III)を43.5mg、各々の結晶として得た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は化合物(I)の純メタノール溶液(曲線a)、0.02%規定培養液を含む90%メタノール溶液(曲線b)、及び0.01%規定水酸化ナトリウムを含む90%メタノール溶液(曲線c)中の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

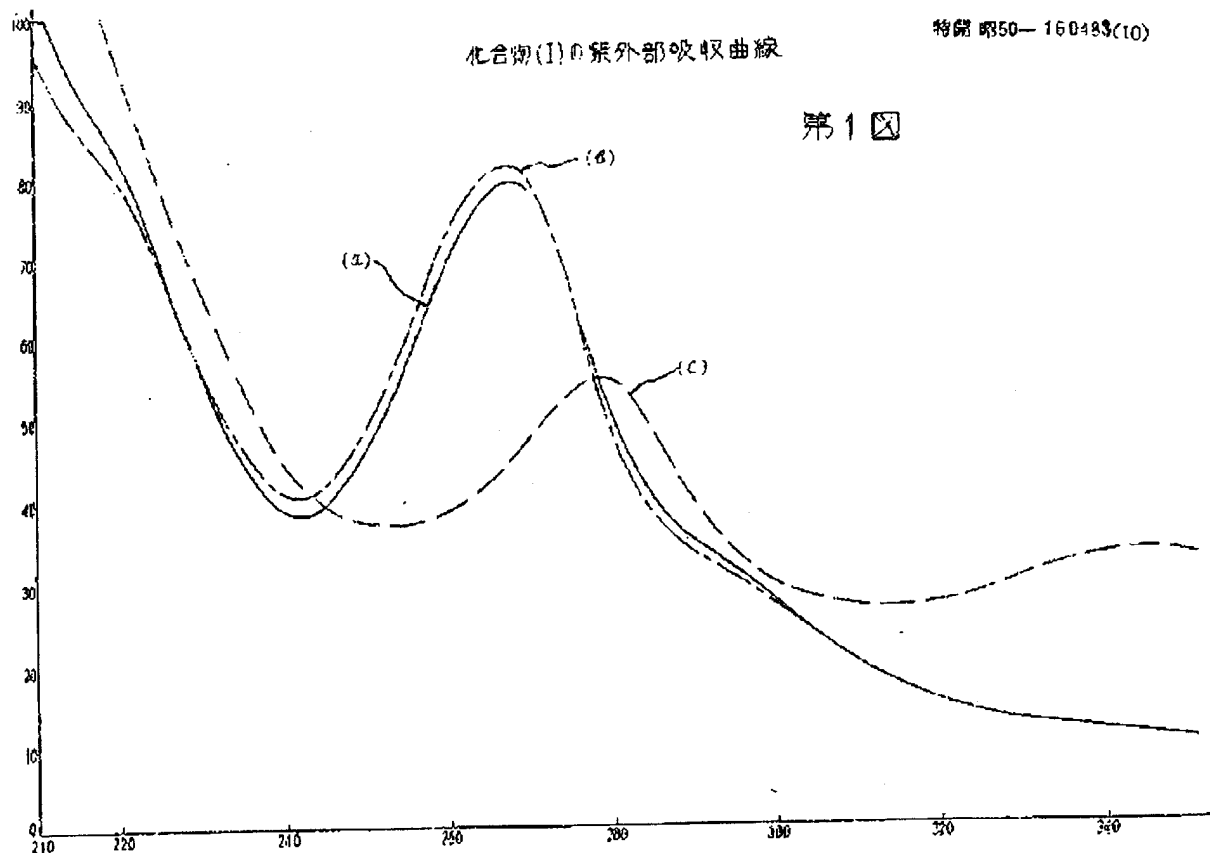
第2図は第1図と同様の溶剤中での化合物(II)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第3図は第1図と全く同様の溶剤中での化合物(III)の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

第4図、第5図、第6図はそれぞれを臭化カリウム錠剤中で測定した時の化合物(I)、II、IIIの紫外線吸収スペクトル曲線を示したものである。

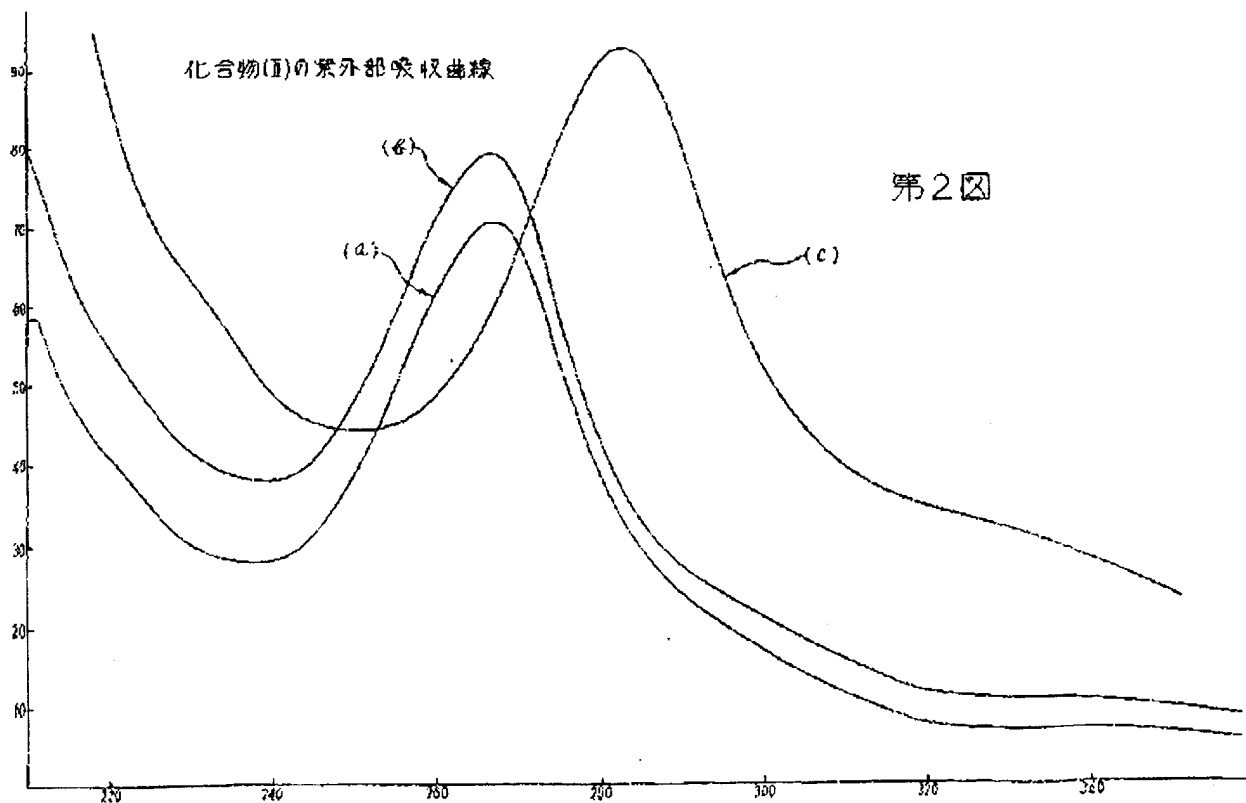
化合物(I)の紫外吸収曲線

第1図

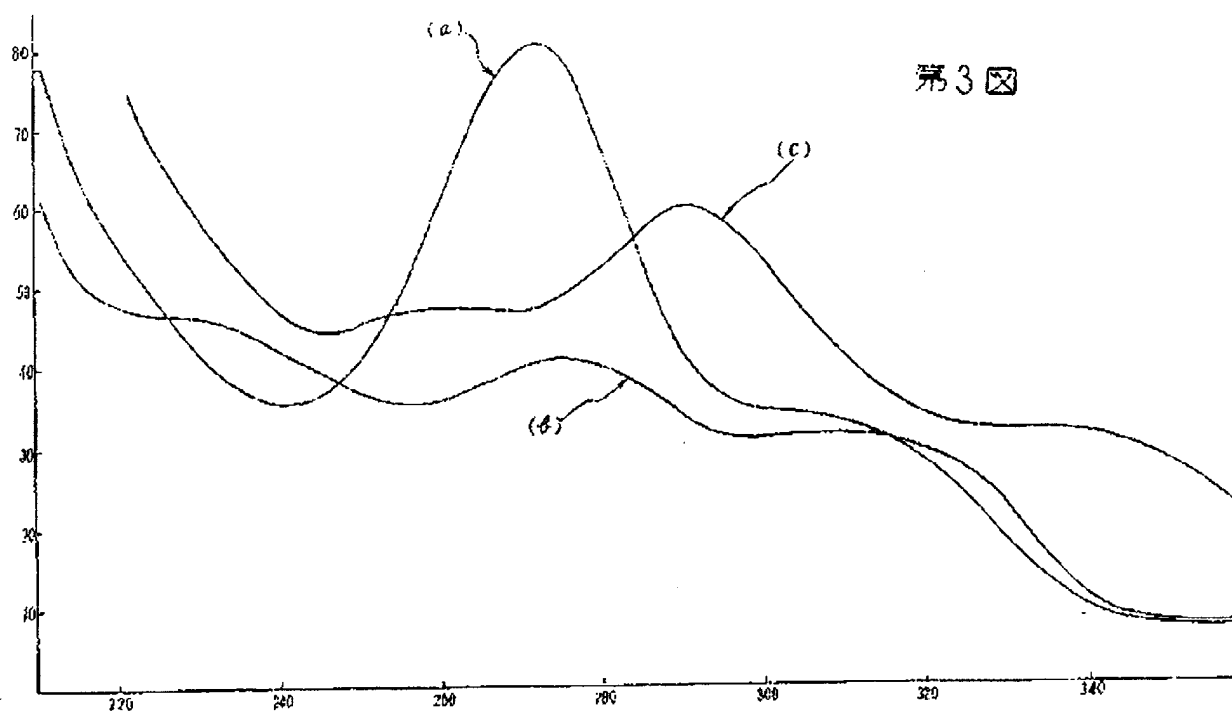


化合物(II)の紫外吸収曲線

第2図

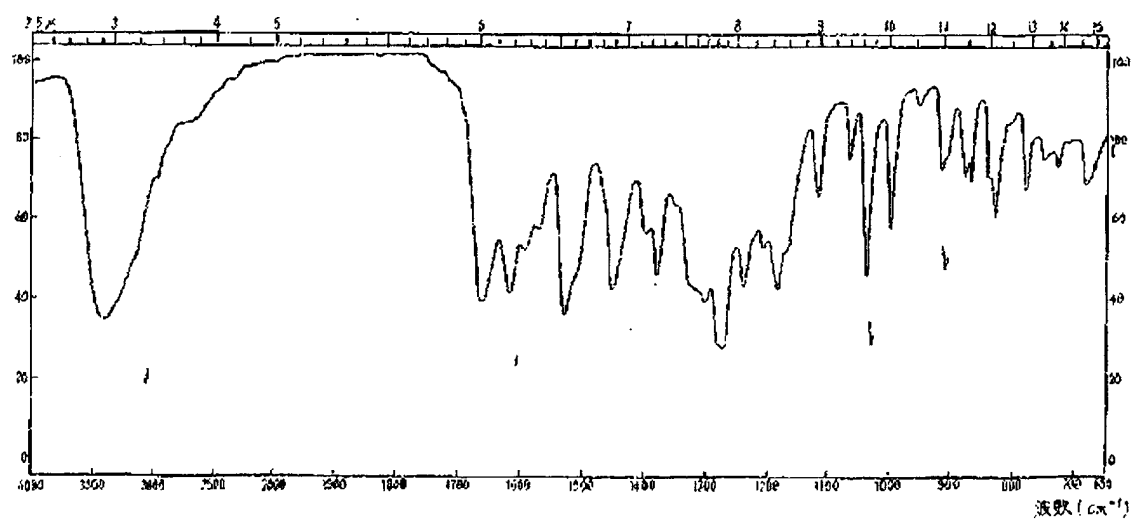


化合物(Ⅲ)の紫外吸収スペクトル曲線



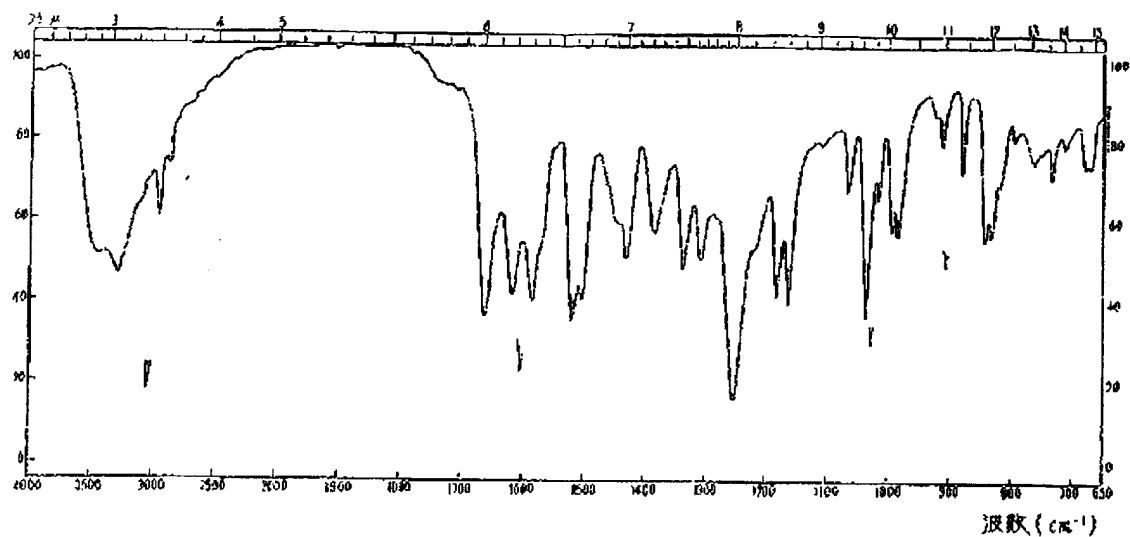
第4図

化合物(Ⅰ)の赤外吸収スペクトル曲線



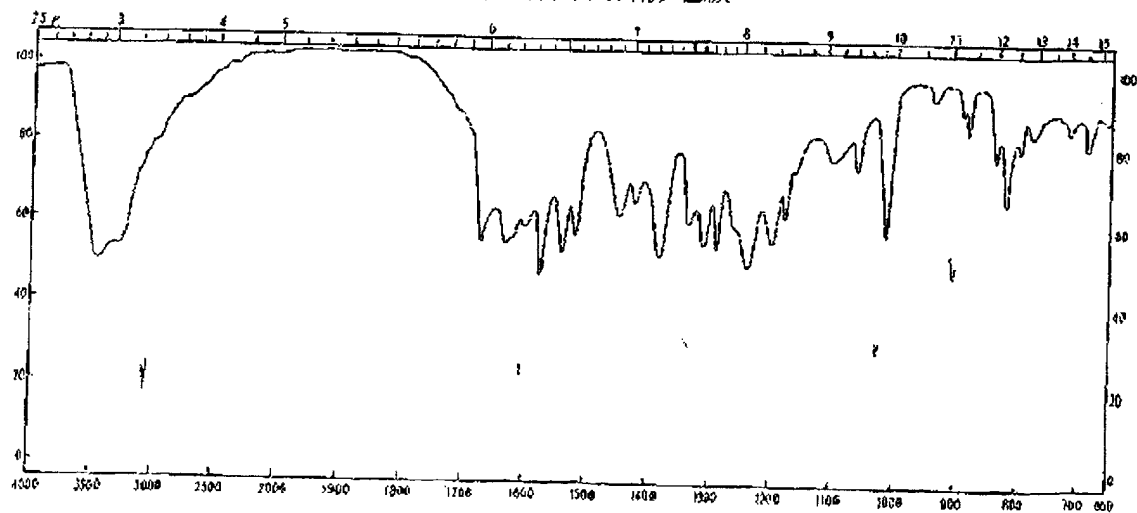
第5図

化合物(I)の赤外吸収スペクトル曲線



第6図

化合物(II)の赤外吸収スペクトル曲線



6. 添附書類の目録

- | | |
|----------------|----|
| (1) 明細書 | 1通 |
| (2) 図面 | 1通 |
| (3) 委任状 | 1通 |
| (4) 新書調本 | 1通 |
| (5) 微生物受託番号通知書 | 1通 |

7. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
ニューフジマンション701-A

氏名 竹内 吉雄

住所 東京都世田谷区東玉川町2丁目12番地

氏名 声 橋 広 敏

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産ビル内

氏名 朝 内 忠 夫

同所 八 木 田 茂

同所 浜 野 孝 雄

同所 森 田 智 二

特開 昭50-160483(13)
手続補正書 (自発)

昭和 49 年 10 月 3 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 49 年 特 許 願 第 69119 号

2. 発明の名称 生理活性を有するインフラゴン
化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

発明との関係

特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目1番23号

氏名 財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産ビル内

(2400) 氏名 金 丸 義 男

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

A. 補正の内容

- (1) 明細書第3頁第6行の「パー・キンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
- (2) 同第4頁第4行の「Wilson」を「Wilson」と訂正する。
- (3) 同第7頁第8行の「パーキンソン」を「パーキンソン」と訂正する。
- (4) 同第10頁第9行の「。」を削除する。
- (5) 同第11頁第10行の「キター」の次に「69/10」を加入する。
- (6) 同第11頁第4行（下から）の「エードーバ」の前に「総漢字で」を加入し、「セル／ム」を「ム」と訂正する。
- (7) 同第11頁第3行（下から）の「セル／ム」を「ム」と訂正する。
- (8) 同第12頁第1行の「セル／ム」を「ム」、
「イソブ」を「イブ」とそれぞれ訂正する。
- (9) 同第12頁第2～3行の「セル／ム」を

「台わせ、」を削除し「4の値台形表に決定する試料の、10を加え」を加入する。

(10) 同第12頁第5行の「アンバライト」を「アンバーライト」と訂正する。

(11) 同第12頁第12行の「エタノール」の次に「。」を加入する。

(12) 同第12頁第13行の「エチール」を「エチル」と訂正する。

(13) 同第12頁第14行の「ブテール」を「ブチル」、
「エチー」を「エチ」とそれぞれ訂正する。

(14) 同第12頁第15行の「クローク」を「マリンクロフト社製レリフク&エローク」と補正する。

(15) 同第12頁第16行～18行の「マリンクロフト」を削除する。

(16) 同第13頁第6行の「マスペクトルグラフイー」を「マスペクトロメトリー」と補正する。

(17) 同第13頁第3行の「340」を「3400」と訂正する。

(18) 同第13頁第10行の「分子式」を「分子重及び分子式」、
「300」を「300, C₁₄H₁₂O₄」,

「286」を「286, 010 010 010」と補正する。

114 同第2の図解1の第8行、第9行、第10行の各「nn」をいずれも「nn」と訂正する。

115 同第2の図解2の「Experimental」を「Experimental」と訂正する。

121 同第2の図解7行および第9行の「ブチール」を「ブカル」と訂正する。

122 同第2の図解7行の「シリシリツク。ブドCC-7」を「シリツク&BCC-7。」と補正する。

123 同第2の図解8行の「外質」を「物質」、「5ヶ」を「5個」と訂正する。

124 同第2の図解8行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正する。

125 同第2の図解8行の「メタノール」の次に「・」を加入する。

126 同第2の図解9行（下から）の「2多、」の次に「グルコースノ多、ソイビーンミール多、」を加入する。

127 同第2の図解6行（下から）の「き」を削除する。

128 同第2の図解5行（下から）の「し、」の次に「固体抗凝剤を合せて」を加入する。

129 同第2の図解5行～第7行の「CC-7をスペシャルーマリンドロフト」を「マリンドロフトはシリツク&BCC-7, スペシャル」と補正する。

130 同第2の図解9行（下から）の「シリシリツク」を「シリツク」と訂正し、「-7」の次に「・」を加入する。

131 同第2の図解6行（下から）の「メタノール」の次に「・」を加入する。